

学校编码: 10384
学号: 21720061152247

分类号____密级____
UDC____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

戊型肝炎病毒衣壳蛋白的线性中和性表位
的研究及其一种表位疫苗的设计与构建

Study of Linear Neutralizing Epitopes of Hepatitis E Virus
Capsid Protein and Design and Construction of
Epitope-based Vaccine

唐 明

指导教师姓名: 苗季副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 6 月

论文答辩时间: 2009 年 6 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: 曾 定 教 授

评 阅 人: 周 珮 教 授

孙 慧 副 教 授

2009 年 6 月

戊型肝炎病毒衣壳蛋白的线性中和性表位的研究及其一种表位疫苗的设计与构建

唐 明

指导教师: 苗季
副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录	
中文摘要.....	1
Abstract.....	2
缩略词 Abbreviations.....	4
前 言.....	6
一 戊型肝炎及戊型肝炎病毒.....	6
1. 戊型肝炎病毒概况.....	6
2. 戊型肝炎病毒基因组.....	7
3. 戊型肝炎病毒研究模型.....	10
二 HEV 疫苗及免疫应答的研究进展.....	12
1. HEV 疫苗的研究简介.....	12
2. HEV 体液免疫相关研究.....	13
3. HEV 细胞免疫相关研究.....	19
三 表位疫苗.....	20
1. 表位疫苗研制和设计的理论基础.....	20
2. 表位的鉴定和疫苗载体的选取.....	22
3. 表位疫苗的应用及优缺点.....	26
四 本研究的设计思路及目的、意义.....	28
材料与方法.....	31
一 材 料.....	31
1. 主要仪器.....	31
2. 主要试剂与材料.....	32
3. 培养基及常用溶液配制.....	34
二 方 法.....	36
1. 基因克隆.....	36
2. 蛋白表达纯化及性质鉴定.....	38
3. 细胞生物学实验方法.....	41
4. 抗体的制备.....	44
5. 抗体的性质分析.....	47
6. 计算机辅助分析与设计.....	49
结果与分析.....	50

一 HEV ORF2 单克隆抗体对应的表位性质分析	50
1. HEV ORF2 单克隆抗体库的性质分析	50
2. 几株代表性单克隆抗体性质的比较	53
3. 单克隆抗体 12A10 对应表位的序列保守性及免疫原性分析	57
二 表位基于蛋白展示技术的融合改造	61
1. HBc 表位肽融合质粒克隆构建	61
2. 表位肽融合蛋白的表达纯化及鉴定	63
3. 表位肽融合蛋白免疫小鼠及血清性质分析	67
三 展示颗粒免疫血清的病毒反应性和中和活性分析	70
1. 免疫血清的病毒捕获能力分析	70
2. 免疫血清对 HEV ORF2 重组蛋白吸附细胞的阻断	71
3. 免疫血清对 HEV 病毒吸附细胞的阻断	73
讨 论	75
一 基于 ORF2 重组蛋白的 HEV 抗原线性表位性质	75
1. HEV 抗原线性表位对应抗体的性质分析	75
2. HEV 表位研究存在的问题	77
二 表位肽及其类病毒颗粒展示载体的免疫特性	79
1. 表位肽作为免疫原的特点	79
2. 类病毒颗粒 HBc 作为载体的优势	79
三 非免疫优势表位及其展示后的性质分析	80
1. HEV 非主要免疫优势区表位的中和活性分析	80
2. 颗粒蛋白展示表位的研究和其作为疫苗的特点	82
小结与展望	84
参考文献	87
致 谢	97
在校期间发表论文	98

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English.....	2
Abbreviations.....	4
Introduction	6
I . Hepatitis E and Hepatitis E virus.....	6
1. Overview of Hepatitis E virus.....	6
2. Genome of Hepatitis E virus.....	7
3. Research progress of Hepatitis E virus	10
II . HEV vaccine and immune response mechanism	12
1. Progress of HEV vaccine development	12
2. Summary of HEV humoral immunity.....	13
3. Summary of HEV cell-mediated immunity	19
III. Epitope-based vaccine	20
1. Theoretical basis of epitope-based vaccine.....	20
2. Identification of epitope and selection of vaccine carrier	22
3. Application and character of epitope-based vaccine.....	26
IV. The purpose and meaning of this thesis.....	28
Materials and Methods	31
I . Materials	31
1. Main instruments	31
2. Main reagents and materials	32
3. Medium and common solutions.....	34
II . Methods.....	36
1. Gene clone	36
2. Protein expression, purification and analysis.....	38
3. Experiments of cytobiology	41
4. Production of antibodies	44
5. Analysis of antibodies	47
6. Computer aided analysis and design.....	49
Results	50

I . Epitope analysis of HEV ORF2 monoclonal antibodies	50
1. The nature of HEV ORF2 monoclonal antibodies.....	50
2. Comparison of several representative antibodies	53
3. Analysis of 12A10 monoclonal epitope	57
II . Epitope display based on carrier protein	61
1. Construction of HBc-epitope fusion plasmids	61
2. Expression, purification and identification of fusion proteins.....	63
3. Analysis of serums from mice immunized with fusion proteins.....	67
III. Immunity analysis of HBc epitope fused protein.....	70
1. Serum analysis of virus immunocapture.....	70
2. Serum analysis of blocking cell binding of recombinant proteins.....	71
3. Serum analysis of blocking cell adsorption of nature viruses	73
Conclusion and Discssion.....	75
I . The nature of HEV linear epitopes	75
1. The nature of HEV monoclonal antibodies and their epitopes	75
2. Problems of HEV epitope research.....	77
II . Immunologic properties of epitopes and vaccine carrier	79
1. Character of epitope peptides as immunogen	79
2. Advantages of HBc virus-like particles as vaccine carrier	79
III. Analysis of neutralizing epitopes and epitope-based vaccine	80
1. Nature of nondominant HEV neutralizing epitopes.....	80
2. Character of HBc-epitope fusion protein as vaccine	82
Brief summary	84
References	87
Acknowledgements.....	97
Appendix	98

中文摘要

戊型肝炎是由戊型肝炎病毒引起的、经消化道传播的急性肝炎，在发展中国家及发达国家均有流行。越来越多的研究证据表明戊型肝炎为人兽共患病，其病毒潜在由动物到人的交叉感染而导致传播的危险，这使得戊型肝炎逐渐成为严重威胁人类健康的疾病。由于至今尚未建立有效的病毒分离方法和细胞培养模型，也缺乏便捷实用的动物模型，国内外学者对戊型肝炎病毒的研究还不够充分。为提供更有效的疾病防治方案，人们迫切需要研究清楚戊型肝炎病毒的抗原表位结构和免疫应答机制。

本研究首先利用针对戊型肝炎病毒的抗体库，采用基于改造蛋白和重叠肽库的表位鉴定技术、抗体竞争抑制性分析、抗体免疫捕获病毒分析、基于重组衣壳蛋白吸附细胞模型或病毒结合细胞模型的抗体性质分析等方法，较详尽地考察抗体的各种性质。其次，分析对比了代表性表位，进行了序列比对、表位突变分析，这对认识戊型肝炎病毒复杂的抗原表位和疫苗设计有着重要的意义。再次，利用颗粒性蛋白载体构建表位融合蛋白从而充分地展示了表位，发现了其中 12A10 抗体对应的非优势表位具有一定的中和性，可以作为表位疫苗设计的候选表位。

本论文尝试在戊型肝炎病毒重组衣壳蛋白的基础上阐释了戊型肝炎病毒抗原表位，筛选出具有代表性的表位并进行深入的分析比较，尝试在这些表位基础上对其表位疫苗设计进行了初步的探索。这不仅为表位的深入研究提供了方法参考和研究思路，有助于对戊型肝炎病毒抗原全面深入的了解；还有利于其病理研究和疫苗研制，对戊型肝炎病毒表位疫苗设计具有很好的参考价值。

关键词：戊型肝炎病毒；表位疫苗；中和性抗原表位；线性表位

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Hepatitis E Virus (HEV) has emerged to be a dominant cause of acute hepatitis, which is often associated with outbreaks and epidemics in both developing and industrialized countries. Accumulating evidence indicated that hepatitis E was a zoonotic disease. The ability of cross-species infection of HEV raised potential public health concerns for zoonotic HEV transmission which might become a great threat to human health. Researches into this pathogen were not enough to make the mechanisms of HEV replication and pathogenesis clearly understood, this was mainly due to the lack of efficient virus isolation method and cell culture system or a practical animal model. For providing better disease prevention and control program, we need very much to investigate the nature of this antigen and its immune response mechanism.

In this research, a pool of anti-HEV antibodies immunized from truncated capsid proteins were firstly studied in detail. Technique used were including epitope identification based on recombinant proteins or overlapping peptide libraries, analysis of competitive inhibition of antigen-antibody reaction, RT-PCR analysis of virus immune capture and analysis of the nature of antibodies based on cell binding model of recombinant proteins which could form virus-like particle or virus-cell adsorption model. Secondly, some representative epitopes were analysed and compared by multiple alignment and mutation analysis, which could help to understand the complex HEV epitopes and be of great importance to vaccine design. Thirdly, in order to enhance the immunogenicity of epitopes, we fully display epitopes by constructing epitope fusion proteins using HBcAg virus-like particles as a vector. Serial analysis of serums from immunized BALB/c mouse demonstrated the 12A10 epitope, one non-immunodominant epitope, had the ability of neutralizing HEV nature virus. The result indicated that this epitope might serve as candidate epitope for epitope-based vaccine design.

In conclusion, this thesis attempted to illuminate HEV epitopes based on recombinant capsid proteins, analysis selected representative epitopes in more details and made a tentative research on epitope-based vaccine design. A vaccine against HEV is not yet available. Existing vaccine candidates were based on modification of HEV capsid protein, rather than epitope-based vaccine design technology. So, this research was not only helpful for in-depth study of HEV epitopes by providing some research methods, but also beneficial to pathological research and vaccine development, which had a good reference value for design of HEV epitope-based vaccine.

Key word: Hepatitis E Virus (HEV); Epitope-based vaccine; Neutralizing epitops; Linear epitops

缩略词 Abbreviations

- ALT: Alanine amino Transferase, 丙氨酸转氨酶
- AST: Aspartate amino Transferase, 天冬氨酸转氨酶
- Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素
- APCs: Antigen Presenting Cells, 抗原呈递细胞
- BCR: B cell receptor, B 细胞表位
- CTL: Cytotoxic T Lymphocyte, 细胞毒 T 淋巴细胞
- Da: Dalton, 道尔顿
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附分析
- EM: Electron Microscopy, 电子显微镜
- ET-NANBH: Enterically Transmitted Non-A Non-B Hepatitis, 急性传染性非甲非乙型肝炎
- FBS: Fetal Bovine Serum, 胎牛血清
- HBcAg: Hepatitis B Core Antigen, 乙型肝炎病毒核心抗原
- HBV: Hepatitis B virus, 乙型肝炎病毒
- HCC: Hepatocellular carcinoma, 肝细胞癌
- HCV: Hepatitis C virus, 丙型肝炎病毒
- HE: Hepatitis E, 戊型肝炎
- HEV: Hepatitis E Virus, 戊型肝炎病毒
- HLA: Human Leucocyte Antigen, 人白细胞抗原
- HSP: Heat shock protein, 热休克蛋白
- IEM: Immuno-electron microscope, 免疫电镜
- IFN: interferon, 干扰素
- Kan: Kanamycin, 卡那霉素
- kD: kilo Daltons, 千道尔顿
- MAB: monoclonal Antibody, 单克隆抗体(单抗)

MHC: Major Histocompatible Complex, 主要组织相容性复合物

NCBI: National Center for Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心

NCR: Non-coding region, 非编码区

NK: Natural killer, 自然杀伤细胞

NPLs: Natural peptide libraries, 天然肽库

ORF: Open Reading Frame, 开放读码框架

PCR: Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链反应

RdRp: RNA-dependent RNA polymerase, RNA 依赖的 RNA 聚合酶

RPLs: Random peptide libraries, 随机肽库

RT: Reverse Transcription, 逆转录

SPF: Standard Pathogen Free, 标准无病原条件

TEM: Transmission Electron Microscope, 透射电子显微镜

TCR: T cell receptor, T 细胞表位

Th: Helper T lymphocyte, 辅助 T 淋巴细胞

VLP(s): Virus-Like Particle(s), 类病毒颗粒

WB: Western Blotting, 蛋白印迹实验

前言

一 戊型肝炎及戊型肝炎病毒

1. 戊型肝炎病毒概况

20 世纪 50 年代, 印度新德里发生了一次因饮用水污染而造成的大面积急性病毒性肝炎。当时人们把这种不明原因的病毒性肝炎命名为肠道非甲非乙型肝炎 (Enterically Transmitted Non-A Non-B Hepatitis, ET-NANBH)。1990 年 Reyes 等^[1] 对这一引起 ET-NANBH 的病原进行克隆测序。随后将其正式命名为戊型肝炎(戊肝), 相应的病原体被命名为戊型肝炎病毒(Hepatitis E Virus, HEV)^[2]。

HEV 为正二十面体单链正义 RNA 病毒, 无包膜, 主要经粪口途径传播。有两种流行模式: 一种是由粪便污染水源引起的大规模暴发流行, 主要发生在不发达国家和地区; 另一种是由于个人及公共卫生不良导致的散发流行, 在全世界范围内广泛存在(图 1)^[3]。近年来, 越来越多的资料表明, HEV 或与其相似的病原

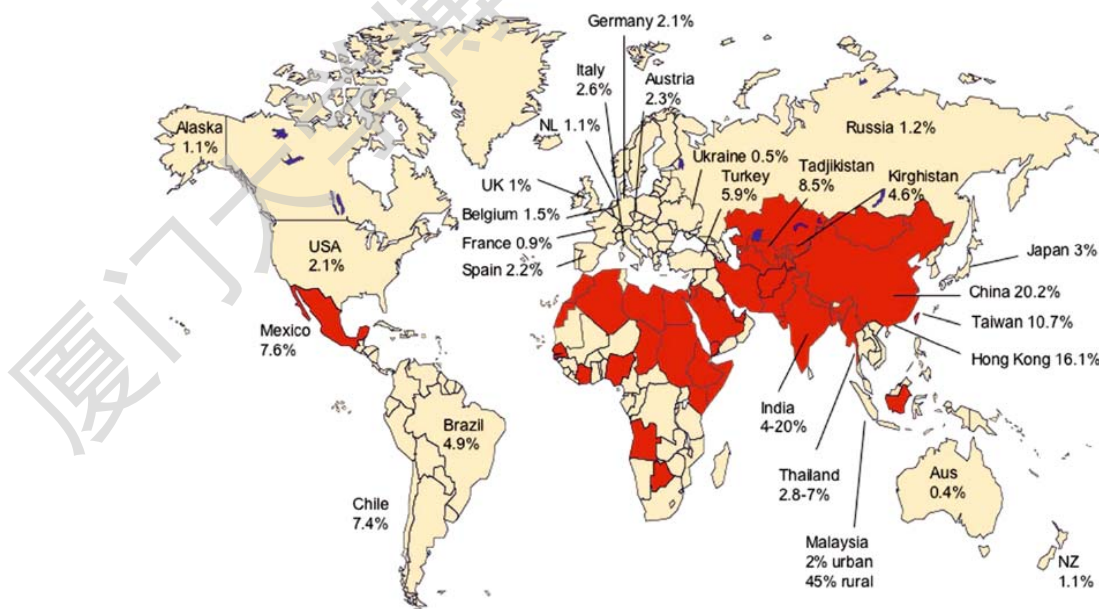


图 1 HEV全球流行区域分布图^[3]

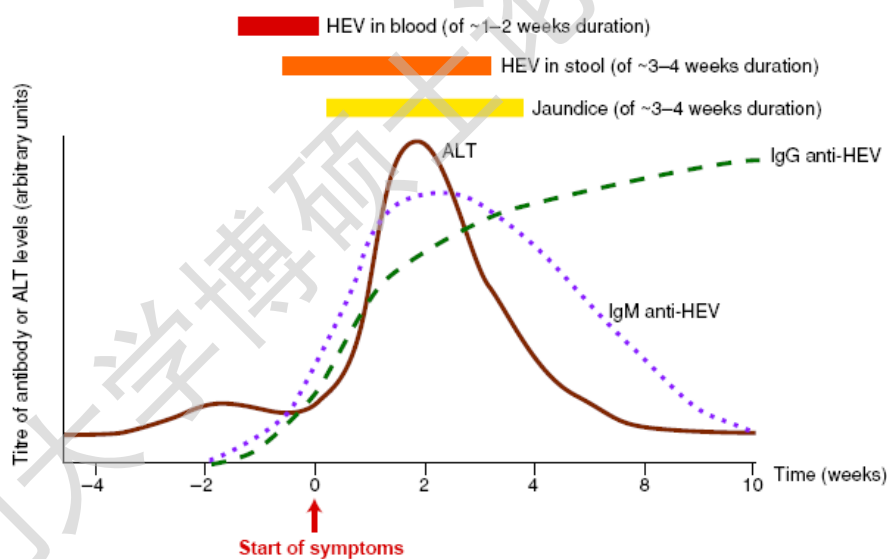
Fig.1 HEV endemic areas and global seroprevalence^[3]

Red areas indicate regions that are endemic for hepatitis E and where >25% of acute viral hepatitis is due to HEV.

Superimposed are seroprevalence rates of HEV from various countries, determined in independent studies.

体不仅分布于人类中，亦广泛分布于多种动物体内，且发现不同物种之间存在交叉感染^[4-7]，这些都提示戊型肝炎可能是一种人兽共患病。

戊型肝炎(戊肝)为自限性疾病，一般不发展为慢性。患者一般有发热、恶心的流感样前驱症状。大部分患者在流感样症状后开始缓解或维持一个亚临床症状。戊肝临床表现不一，但一般具黄疸。与甲肝类似，戊肝呈一过性感染，其各项实验室检测指标(包括转氨酶、胆红素、血清碱性磷酸酶等)一般在 1-6 周内恢复正常。儿童感染 HEV 后多表现为亚临床型，成人则多为临床型感染，一般感染后 1-3 周内即可从血液和粪便中检出病毒(HEV 的感染病程见图 2)^[8]。本病多见于青壮年，男性发病率高于女性，孕妇易感性高，重症者较多，且早产、死胎率高。戊肝总病死率与甲肝相似或稍高，为 0.2-4%，但孕妇戊肝的病死率高达 10-20%，其机制尚未阐明^[9-11]。



Time course of hepatitis E virus infection
Expert Reviews in Molecular Medicine © 1999 Cambridge University Press

图 2 HEV 感染进程示意图^[8]

Fig.2 Time course of hepatitis E virus infection^[8]

Modified from the viral hepatitis slide set published by the US Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, at <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset> (fig002sjd).

2. 戊型肝炎病毒基因组

HEV 基因组为单股正链 RNA，大小约为 7.2knt，包含三个开放读码框架(Open Reading Frame, ORF)^[12]。5'端有 m⁷G 的帽子，其后为 28nt 的非编码区(Non-coding

region, NCR), 3'端有 PolyA 尾, 其前同样存在 68nt 的非编码序列。ORF1(nt28-5109) 主要编码病毒的非结构蛋白。ORF2(nt5147-7127) 主要编码病毒的结构蛋白。ORF3 基因大小为 369nt, 在不同基因型 HEV 上的核酸序列对应的编码起始位置不同; 由其编码 123a.a. 的短肽, 具体的生物学功能仍未完全阐明^[13]。HEV 1-3 型以及 4 型基因组示意图见图 3。

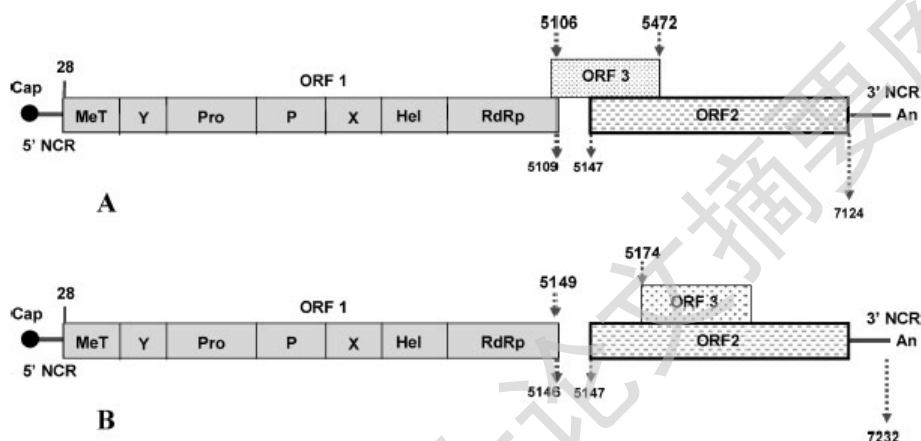


图 3 不同型HEV基因组结构示意图^[13]

Fig.3 Genomic organisation of HEV in genotype 1-3 (A) and in genotype 4 (B) ^[13]

2.1. ORF1

HEV ORF1的序列与其他的正链RNA病毒, 如风疹病毒等, 具有很高的同源性, 如果以ORF1序列为分类标准, 可以将HEV归入类 α 病毒超家族。ORF1编码一个1693a.a.的大蛋白, 为HEV的非结构蛋白: 包括甲基转移酶 (methyltransferase), 木瓜蛋白酶样半胱氨酸酶 (papain-like cysteine protease), 解旋酶 (helicase) 以及RNA依赖的RNA聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[12, 14]。这些非结构蛋白在病毒的早期转录及复制过程中发挥重要的作用, 例如原核表达的RdRp能与HEV基因组的3'NCR直接相互作用, 并且指导反义RNA链的合成。至于ORF1编码的大蛋白是作为一个整体还是剪切形成单一的蛋白酶发挥作用并不是十分清楚, 对其功能的充分阐释也还需要更深入的研究。

2.2. ORF2

HEV ORF2全长1980nt, 由其编码的pORF2为HEV的主要结构蛋白, pORF2能通过非二硫键的方式自组装成病毒衣壳 (capsid)。根据pORF2的氨基酸序列分

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库